DIAGNOSTIC AUTOMATION, INC.
23961 Craftsman Road, Suite E/F, Calabasas, CA 91302
Tel: (818) 591-3030 Fax: (818) 591-8383
onestep@rapidtest.com; technicalsupport@rapidtest.com
www.rapidtest.com

IVD Véase la etiqueta externa 2°C-8°C Σ=96 tests REF
8042-1

Mycoplasma Pneumonia IgG TMB ELISA

No. Catalogo 8042-1

Véase la etiqueta externa 2°C-8°C Σ = 96 tests **REF 8042-1**

PRINCIPIO

El Análisis Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA) se basa en la habilidad de los materiales biológicos (ejem. antígenos) para fijarse a superficies plásticas como el poliestireno (fase sólida). Cuando los antígenos se unen a la fase sólida entran en contacto con el suero del paciente, anticuerpo especifico al antígeno, si está presente, se unirá al antígeno en la fase sólida formando complejos específicos de antígeno-anticuerpo. El exceso de anticuerpo es removido por lavados. Seguido por la adición de conjugado de globulina de cabra anti-humana con peroxidasa de rábano picante, el cual se une luego a los complejos antígeno-anticuerpo. El exceso de conjugado es removido con un lavado, seguido por la adición de substrato cromogénico de tetrametilbenzidina (TMB). Si el anticuerpo específico para el antígeno está presente en el suero del paciente, se desarrolla un color azul. Cuando la reacción enzimática es detenida con H2SO4 1N, el contenido de los pozos se vuelve amarillo. El color, el cual es proporcional a la concentración de anticuerpo en el suero, puede leerse en un espectrofotómetro adecuado o en un lector de placas de pocillos ELISA.

MATERIALES SUMINISTRADOS

Cada kit contiene los siguientes componentes en suficiente cantidad para realizar el número de tests indicados en la etiqueta del empaque.

1. Placa de microanálisis cubierta de antígeno: 96 pozos, 12 tiras 1x8 configuradas. (96T: una placa; 480T: cinco placas)
2. Diluyente de Suero: listo para usarse. Contiene proclina (0.1%) como preservativo, pH 7.5 + 0.2. (96T: una botella, 30 mL; 480T: dos botellas, 60 mL cada una).

3. Calibrador Cutoff: Suero humano. Azida de Sodio (0.1%) y penicilina/estreptomicina (0.01%) agregado como preservativo, con factores específicos del kit impresos en la etiqueta del frasco. (96T: un frasco, 0.4 mL; 480T: un frasco, 0.800 mL)
4. Control Positivo Alto: suero humano. Azida de sodio (0.1%) y penicilina/estreptomicina (0.01%) agregado como preservativo, con el rango establecido impreso en la etiqueta del frasco. (96T: un frasco, 0.4 mL; 480T: un frasco, 0.800 mL)
5. Control Positivo Bajo: suero humano. Azida de sodio (0.1%) y penicilina/estreptomicina (0.01 agregado como preservativo, con el rango establecido impreso en la etiqueta del frasco. (96T: un frasco, 0.4 mL; 480T: un frasco, 0.800 mL)
6. Control Negativo: suero humano. Azida de sodio (0.1%) y penicilina/estreptomicina (0.01%) agregado como preservativo, con el rango establecido impreso en la etiqueta del frasco. (96T: un frasco, 0.4 mL; 480T: un frasco, 0.800 mL)
7. Conjugado de Peroxidasa de Rábano picante (HRP): listo para usarse. IgG de cabra anti-humana, contiene pro DAI. N (0.1%) como preservativo. (96T: una botella, 16 mL; 480T: cinco botellas, 16 mL cada una).
8. Solución Substrato / Cromógeno: Tetrametilbenzidina (TMB), lista para usar. (96T: una botella, 15 mL; 480T: cinco botellas, 16 mL cada una)
9. Tampón de Lavado (concentrado 20X): diluir 1 parte de concentrado + 19 partes de agua deshionizada o destilada. Contiene TBS, Tween-20 (polisorbato 20) y proclina (0.1%) como preservativo, pH 7.2 + 0.2. (96T: una botella, 60 mL; 480T: una botellas, 250 mL)
10. Solución de Parada: lista para usarse, contiene solución H2SO4 1N. (96T: una botella, 15 ml)
Nota: los frascos de suero pueden contener volumen en exceso. Los siguientes componentes no son dependientes del número de lote y pueden ser usados de manera intercambiable dentro del análisis DAI ELISA IgG: Diluyente de suero IgG, Solución substrato/Cromógeno, tampón de lavado, y solución de parada.

PRECAUCIONES

1. Los componentes de suero humano usados en la preparación de los Controles y Calibradores en este kit han sido evaluados por un método aprobado por la FDA que busca la presencia de anticuerpos del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), así como para el antígeno de superficie de la Hepatitis B y fue encontrado negativo. Debido a que ningún test puede ofrecer seguridad total que tanto el VIH, como la Hepatitis B u otros agentes infecciosos estén ausentes, las muestras y los reactivos basados con componentes humanos deberían ser manejados como si fuesen capaces de transmitir agentes infecciosos.

Nota: El Centro para el Control de Enfermedades y el Centro para Dispositivos y Salud Radiológica recomiendan que los agentes potencialmente infecciosos sean manejados con un Nivel 2 de Seguridad Biológica.
2. Los componentes en este kit han sido evaluados para control de calidad como una unidad de Lote Maestro. No mezcle los componentes de diferentes números de lotes excepto el Substrato Cromogénico y el Tampón de Lavado. El diluyente de suero suministrado con el kit IgG puede sólo ser usado con otros kits IgG y el Diluyente de Suero suministrado con kit IgM puede sólo ser usado con otros kits IgM. No mezcles los componentes con los de otros fabricantes.

3. No use reactivos que hayan pasado la fecha de expiración marcada en la etiqueta del empaque.
4. Todos los Reactivos deben estar a temperatura ambiente (21° a 25° C) antes de realizar el análisis. Tome solamente el volumen de reactivos que sean necesarios. **No vierta los reactivos de nuevo en los frascos ya que pueden contaminarse.**
5. Antes de abrir los frascos de Controles y Calibradores, golpear con firmeza sobre la mesa de trabajo para asegurar que todo el líquido esté en la parte inferior del vial.
6. Usar solamente agua destilada o deshionizada y cristalería limpia.
7. No permita que los pozos se sequen durante el análisis; cambie los reactivos inmediatamente después de los pasos de lavado.
8. Evite la contaminación cruzada de los reactivos. Lávese las manos antes y después de manejar reactivos.
9. Si los pasos de lavado son realizados manualmente, los pozos deben ser lavados tres veces. Hasta cinco ciclos de lavado son necesarios, si se usa un equipo automático de lavado.
10. Azida de sodio inhibe la actividad del Conjugado. Se deben usar puntas de pipeta limpias para que la azida de sodio no se mezcle con otros reactivos.
11. Se ha reportado que la azida de sodio puede reaccionar con el plomo y el cobre en las tuberías paras formar compuestos explosivos. Al desechar, use suficiente agua para minimizar la acumulación de compuestos metálicos de azida.
12. Nunca pipetee con la boca, o permita que los reactivos y muestras de pacientes entren en contacto con la piel.
13. Si una solución de hipoclorito de sodio (cloro) es usada como desinfectante, no se exponga al área de trabajo durante el test, por la potencial interferencia con la actividad enzimática.
14. Evite el contacto del ácido sulfúrico con la piel u ojos. Si ocurre el contacto, lave inmediatamente el área con agua.
15. **Precaución:** Los residuos líquidos de pH ácido deben ser neutralizados antes de añadir a las soluciones de hipoclorito sódico (cloro) para evitar la formación de gas venenoso.
16. Sólo para uso de diagnóstico *in vitro*.

MATERIALES REQUERIDOS, PERO NO SUMINISTRADOS

1. Cilindro graduado (100 mL).
2. Matraz (1L).
3. Temporizador - 0 a 60 minutos.
4. Micropipetas capaces de dispensar con exactitud 10-200 mL volúmenes (menos del 3% CV).
5. Agua deshionizada o destilada.
6. Toallas de papel.
7. Botella de lavado, equipo semi automatizado o automatizado de lavado.
8. Lector de microplacas de longitud de onda individual o doble con filtro de 450 nm. Si la longitud de onda dual es usada, configure el filtro de referencia a 600-650 nm. Lea el manual del operador o contacte al fabricante del instrumento para establecer las especificaciones de linealidad del lector.
9. Tubos de ensayo para la dilución del suero.
10. Recipiente para desechos y desinfectante (ej, 0.5% hipoclorito de sodio).

Nota: usar solamente cristalería limpia y seca.

ALMACENAMIENTO Y DURACIÓN DE LOS REACTIVOS

1. Almacene los kits que no han sido abiertos a 2° y 8° C. El kit del test puede ser usado hasta la fecha de expiración del mismo. Véase la etiqueta del empaque para obtener la fecha de expiración.
2. Las placas de microanálisis no abiertas deben ser almacenadas entre 2° y 8° C. Las tiras sin usar deben ser regresadas inmediatamente a una bolsa con cierre hermético con desecante e indicadores de humedad, y colocadas de vueltas en almacenamiento a 2° y 8° C.
3. Almacene el Conjugado HRP entre 2° y 8° C.
4. Almacene el Calibrador, los Controles Positivos y Negativos entre 2° y 8° C.
5. Almacene el Diluyente de Suero y 20X de Tampón de Lavado entre 2° y 8° C.
6. Almacene el Substrato de Cromógeno entre 2° y 8° C
7. Almacene el Tampón de Lavado1X (diluyente) a temperatura ambiente (21° a 25° C) por hasta 5 días, o 1 semana entre 2° y 8° C.
Nota: Si la temperatura de conservación se mantiene constante, los reactivos y el sustrato permanecerán estables hasta la fecha de vencimiento del kit. Se tomaron precauciones en la fabricación de este producto para proteger los reactivos de contaminación y agentes bactereoestáticos han sido agregados a los reactivos líquidos. Se debe tener cuidado para proteger los reactivos en este kit de la contaminación.

RECOLECIÓN DE MUESTRAS

1. Maneje el suero y la sangre como si fuesen capaces de transmitir agentes infecciosos.
2. El rendimiento óptimo de los kits de ELISA DAI depende de la utilización de muestras de suero nuevas (claras, no hemolizado, no lipémico, no ictérico). Un volumen mínimo de 50 ml de suero es recomendado, en caso de que se requiera repetir la prueba. Las muestras deberían ser recolectadas asépticamente. La separación temprana del coagulo minimiza la hemólisis en el suero.
3. Almacene el suero entre 2° y 8° C si la prueba se llevara a cabo en dos días. Si las muestras van a ser guardadas por periodos más largos, almacene a -20° C o a temperaturas más frías. No use un congelador de escarcha porque pueden originar que las muestras pasen por ciclos de descongelamiento y congelamiento y así, degradar el anticuerpo. Muestras que sean almacenadas de manera no apropiada o sean objeto de múltiples congelamientos y descongelamientos pueden dar resultados falsos.
4. Si se han de recolectar sueros en pareja, se deben tomar muestras agudas tan pronto como sea posible luego del inicio de los síntomas y luego de siete días después del inicio. La segunda muestra debe ser recolectada de 14 a 21 días luego de que la muestra aguda fue tomada. Ambas muestras deben ser evaluadas por duplicado en la misma placa para comprobar un aumento significativo. Si la primera muestra fue obtenida muy tarde durante el curso de la infección, no se detectará un aumento significativo.

PREPARACIÓN PARA EL ANÁLISIS

1. Todos los reactivos deben ser removidos de la refrigeración y deben ser llevados a temperatura ambiente antes de usar. 21° y 28° C. Devuelva todos los reactivos a la refrigeración rápidamente después del uso.

2. Todas las muestras y controles deben ser mezcladas (usar mezclador vortex) antes de usarse.
3. Diluya 60 ml de tampón de lavado de 20x Tipo 1 en 1.2 L con agua destilada y/o deshionizada H2O. Mezcle bien.

PROCEDIMIENTO GENERAL

Nota: Para evaluar sueros por duplicado, ambas muestras de suero deben ser evaluadas por duplicado y hechas en la misma placa. Se recomienda que los pares de suero sean realizados en pozos adyacentes.

1. Coloque el número deseado de tiras de pocillo en el marco. Permita seis determinaciones de Control/Cut-off (un Control Negativo, tres Calibradores Cut-off y un Control Positivo Alto) por corrida. Debería ser realizado en cada análisis un reactivo blanco (RB). Revise el software y los requerimientos del lector para las configuraciones apropiadas de Controles/Calibradores. Devuelva las tiras sin usar a la bolsa de cierre hermético con desecantes e indicadores de humedad. Selle y congele inmediatamente.

1A	RB	2A	Paciente #2
1B	NC	2B	Paciente #3
1C	Cal	2C	Paciente #4
1D	Cal	2D	Paciente #5
1E	Cal	2E	Paciente #6
1F	HPC	2F	Paciente #7
1G	LPC	2G	Paciente #8
1H	Paciente #1	2H	Paciente #9

RB = Reactivo En Blanco – Pozo sin adición de suero procesado con todos los reactivos. Utilizado para el lector en blanco.
NC = Control Negativo

Cal = Calibrador

HPC = Control Positivo Alto

LPC = Control Positivo Bajo

2. Diluir los sueros del test, Calibrador cut-off, Controles positivos, negativos, altos, bajos, sueros 1:21 (ej. 10µL + 200 µL) en Diluyente de Suero. (Para diluciones manuales se sugiere dispensar primero el Diluyente del Suero en el tubo de ensayo y luego agregar el suero del paciente).
3. Agregar 100mL del calibrador cut-off en el diluyente apropiado, Controles y sueros de pacientes en pozos individuales. Agregar 100mL de Diluyente de Suero al pozo del reactivo en blanco (A-1). Revise el software y los requerimientos del lector para las configuraciones apropiadas de reactivos en blanco.
4. Incubar cada pozo a temperatura ambiente (21° a 25° C) por veinte (20) + 2 minutos.
5. Aspirar o sacudir el líquido de los pozos. Si se está usando un equipo de lavado automático o semi automático agregar 250-300 µL de Tampón de Lavado Diluido a cada pozo. Aspirar o sacudir y voltee la placa sobre papel absorbente para remover todo el líquido. Repita el procedimiento de lavado dos veces (para un total de tres (3)

lavados) para equipos semi automáticos o manuales, o cuatro (4) veces (para un total de cinco (5) lavados) para equipo automático. Luego del lavado final, seque la placa sobre papel absorbente para eliminar todo el líquido de los pozos.

****NOTA IMPORTANTE:** En cuanto a los pasos 5 y 8 - Un lavado insuficiente o excesivo provocará variaciones en el análisis que afectarán la validez de los resultados. Por lo tanto, para mejores resultados, se recomienda el uso de un equipo semi automatizado o automatizado configurado para dispensar un volumen que llenar completamente el pozo (250-300 mL). Puede ser necesario un total de hasta cinco (5) lavados con el equipo automatizado. Por favor contacté al DAI si existen preguntas en cuanto al equipo de lavado automático. **Remover completamente el Tampón de Lavado luego del último lavado, es crítico para el desempeño preciso del test. También, asegúrese de que no queden burbujas en los pozos.**

6. Agregue 100 µL de Conjugado en cada pozo, incluyendo el pozo de reactivo en blanco (A-1). Evite las burbujas mientras se agrega, ya que pueden dar falsos resultados.
7. Incubar cada pozo por veinticinco (25) + 5 minutos a temperatura ambiente (21° a 25°C).
8. Repita el lavado como se describe en el paso 5.
9. Agregue 100 µL de Solución de Cromógeno/Substrato en cada pozo, incluyendo el pozo del reactivo en blanco, manteniendo un rango constante de adición para toda la placa.
10. Incubar cada pozo de diez (10-15 minutos a temperatura ambiente (21° to 25°).
11. Detener la reacción agregando 100 µL de Solución de Parada (H2SO4 1N) siguiendo el mismo orden de adición de substrato, incluyendo el pozo del reactivo en blanco. Golpear suavemente la placa por los bordes, para mezclar el contenido de los pozos. La placa puede ser mantenida por hasta una (1) hora después de agregar la Solución de Parada antes de leer.
12. El color desarrollado debe ser leído en un lector de placas de ELISA equipado con un filtro de 450nm. Si se esta usando longitud de onda dual, configure al filtro de referencia de 600-650 nm. El instrumento debería ser llevado a cero. El reactivo blanco debe dar una absorbancia menor de 0.150 a 450 nm. Si el reactivo blanco es > 0.150 la prueba debe ser repetida. Blanquee el lector con el pozo en blanco y luego lea la placa completa. Deseche las placas utilizadas una vez realizada la lectura.

CONTROL DE CALIDAD

Para que el análisis sea considerado válido, deben cumplirse las siguientes condiciones:
1. Calibrador y los controles deben procesarse con cada prueba.
2. Reactivo en Blanco (cuando es leído en contra del reactivo en blanco al aire) debe ser de < 0.150 Absorbancia (A) a 450 nm.
3. El Control Negativo debe ser de < 0.250 A a 450 nm (cuando es leído contra el reactivo blanco al aire).
4. Cada Calibrador debe ser de > 0.250 Absorbancia a 450 nm (cuando es leído contra el reactivo blanco al aire).
5. El Control Positivo debe ser de > 0.500 Absorbancia a 450 nm (cuando es leído en contra el reactivo blanco).
6. DAI recomienda que un Control Positivo de reactividad conocida sea incluido en cada análisis, que se ejecute como parte del programa del usuario el control de calidad.
7. Los valores del ISR o “Immune Status Ration” (Ración de Estado Inmune) para el

control positivo y negativo debe estar en el rango respectivo, de acuerdo a las etiquetas impresas en los frascos. Si los valores de los controles no están dentro de los valores respectivos, el test debe ser considerado inválido y debe ser repetido.
8. Si los citeriores previamente mencionados no se cumplen en la repetición de la prueba, contacte el DAI Technical Service (Servicio Técnico del DAI).

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

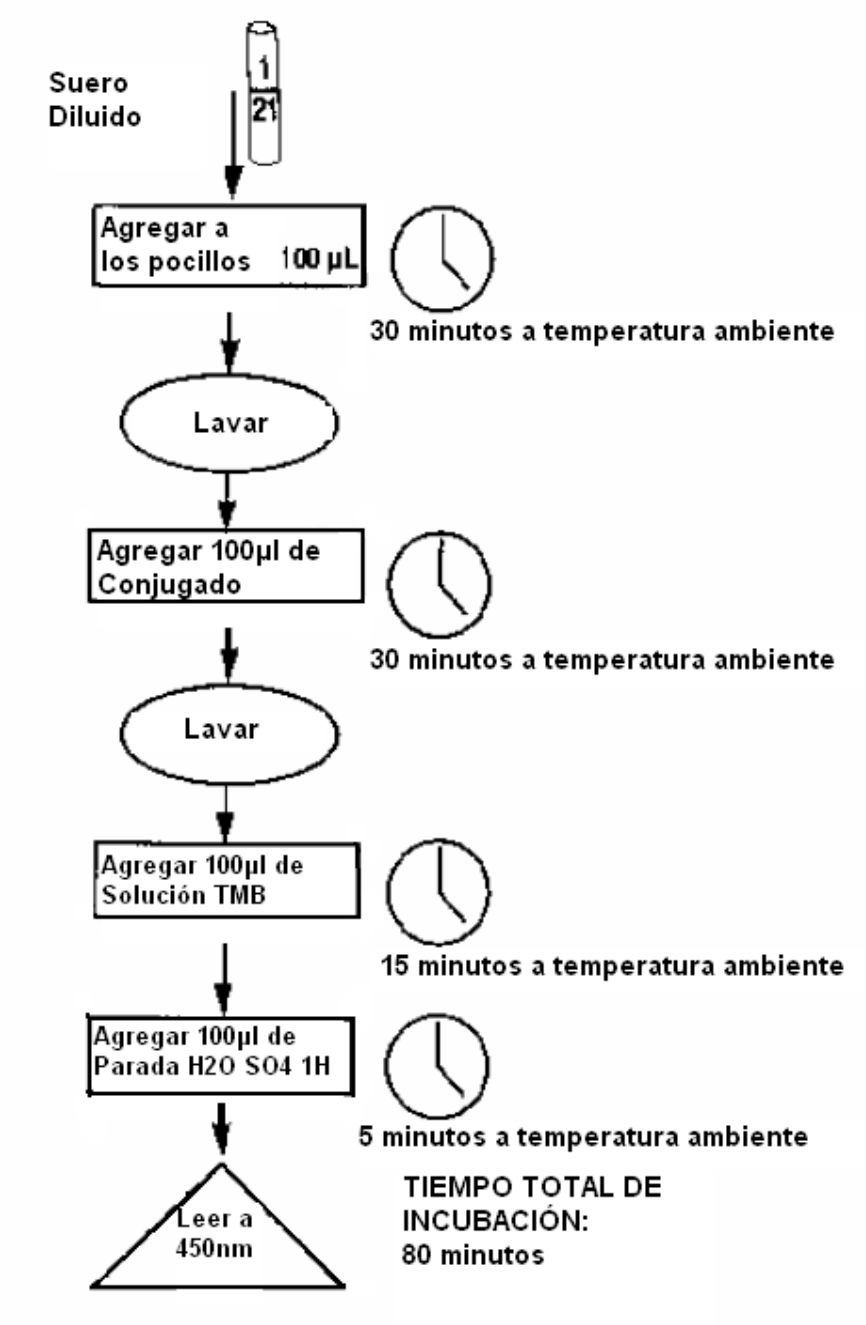
1. Multiplique la absorbancia media de los calibradores por el factor asignado. Este es el valor del calibrador. **El factor es específico del Lote Maestro y está registrado en la lista de embalaje del kit y en la etiqueta del frasco del calibrador.**
2. El valor ISR para cada muestra del pacientes es calculando dividiendo la absorbancia de la muestra por el valor del calibrador (obtenido en el Paso 1).

ISR	Resultados	Interpretación
<0.90	Negativo	Ausencia de anticuerpos detectables por la prueba de ELISA. Estas personas se presume que no está infectada y son susceptibles a la infección primaria
0.91-1.09	Equívoco	Las muestras deben ser reexaminadas. Ver Número (3) a continuación.
>1.10	Positivo	Indica la presencia de anticuerpos detectables por el test ELISA. Indicativa de infección actual o anterior. El individuo puede estar en riesgo de transmitir infecciones, pero no necesariamente es contagiosa en la actualidad.

LIMITACIONES

1. Se le recomienda al usuario de este kit leer cuidadosamente y entender el inserto del empaque. Es necesaria estricta adherencia al protocolo para obtener resultados confiables. En particular, el muestreo correcto y pipeteo del reactivo, junto con un lavado y coordinación de los pasos de incubación cuidadoso, son esenciales para lograr resultados precisos.
2. Este kit está diseñado para medir el anticuerpo IgG en las muestras de pacientes. Resultados positivos en neonatos deben ser interpretados con precaución, debido a que IgG maternal es transmitido de forma pasiva de la madre al feto antes del nacimiento. Los análisis de IgM son generalmente indicadores más útiles de infección en niños de menos de 6 meses de edad.
3. Las muestras recogidas muy temprano en el curso de una infección pueden no tener niveles detectables de IgG. En tales casos, se recomienda realizar un análisis IgM, o tomar una segunda muestra de suero de 14 a 21 días después de ser analizados en paralelo con la muestra original para determinar la seroconversión.
4. Las muestras que siguen siendo dudosas tras repetir la prueba debe ser analizado de nuevo por un método alternativo, por ejemplo, un análisis de inmunofluorescencia (IFA). Si los resultados siguen siendo equívocos luego de repetir la prueba, entonces se deben tomar muestras adicionales.

5. Los resultados de la determinación de anticuerpos en una sola muestra no deberían ser usados para diagnóstico de infecciones recientes. Muestras pares (aguda y de convalecencia) deben ser recolectadas y evaluadas concurrentemente para buscar seroconversión o un aumento significativo en el nivel del anticuerpo.
6. Los valores obtenidos de este análisis estan destinado a ser sólo una ayuda para el diagnóstico. Cada medico debe interpretar los resultados a la luz de la historia del paciente, descubrimientos físicos y otros procedimientos de diagnósticos.



REFERENCIAS:

1. Falk R. J., and Jennet J.C. 1988. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerolonephritis. New England J. Med. 318:1651-7.
2. Kallenbarg C.G.M., et al. 1991. Autoimmunity to lysoomal enzymes: new clues to vasculitis and glomerulonephritis: Immunol. Today. 12:61-4
3. Falk R. J., et al. 1990. Clinical Course of Anti-Neutrophil Cytoplasmic Autoantibody – associated Glomerolonephritis and Systematic Vasculitis. Am. Intern. Med. 113:656-63.
4. Nolle B., et al. 1989. Anticytoplasmic Autoantibodies: Their Immunodiagnostic Value in Wegener Granulomatosis. Am. Intern. Med. 111:28-40.
5. Niles J.L, et al. 1989. Wegener's Granulomatosis Autoantigen is a Novel Neutrophil Serine Proteinase. Blood. 74:1888-93
6. Gallicchio M.C. and Savige J.S. 1991. Detection of Antimyeloperoxidase and anti-elastase antibodies in vasculitides and infections. Clin. Exp. Immunol. 84:232-7.
7. Hagen E.C., et al. 1993. Antineutrophil Cytoplasmic Autoantibodies: A review of the Antigens Involved, the Assays, and the Clinical and Possible Pathogenic Consequences. Blood. 81:1996-2002.
8. CDC/NIH Guidelines: Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 2nd Edition, 1993.
9. Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture. Approved Standard NCCLS Publication, H3-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Villanova, PA.
10. **Engvall, E., and P. Perlman.** 1971. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, (ELISA) Quantitative Assay of Immunoglobulin G. *Immunochemistry*. 8:871-874.
11. **Engvall, E., and P. Perlman.** 1971. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA. Peeters. H., ed. In: *Protides of the Biological Fluids*. Proceedings of the Nineteenth Colloquium, Brugge, Oxford. Pergamon Press. pp 553-556.
12. **Engvall, E., K. Jonsson, and P. Perlman.** 1971. Enzyme- Linked Immunosorbent Assay. II. Quantitative Assay of Protein Antigen, Immunoglobulin-G, By Means of Enzyme- Labelled Antigen and Antibody-Coated tubes. *Biochem. Biophys. Acta.* 251: 427-434.
13. **Van Weeman, B. K. and A. H. W. M. Schuurs.** 1971. Immunoassay Using Antigen-Enzyme Conjugates. *FEBS Letter.* 15:232-235.
14. **NCCLS.** 1991. National Committee for Clinical Laboratory Standard. Internal Quality Control Testing: Principles & Definition. NCCLS Publication C24-A.
15. **http://www.cap.org/html/ftpdirectory/checklist.html.** 1998. Laboratory General – CAP (College of American Pathology) Checklist (April 1998). Pp 28-32.
16. **NCCLS**. 1997. National Committee for Clinical Laboratory Standard. Preparation and testing of Reagent Water in the Clinical Laboratory. NCCLS Publication C3-A3.

DIAGNOSTIC AUTOMATION, INC.
23961 Craftsman Road, Suite E/F,
Calabasas, CA 91302
Tel: (818) 591-3030 Fax: (818) 591-8383
ISO 13485-2003

Fecha de Revisión: 29/03/06